

Comunidades algales y estrategias de *Tetraselmis contracta* (Prasinophyceae) en humedales costeros del norte y centro del territorio peruano

Algal communities and strategies of *Tetraselmis contracta* (Prasinophyceae) from north and central coastal wetlands at Peruvian land

Haydee Montoya T., Cecilia Barberena L., José Gómez C. & Mauro Mariano A.

Laboratorio de Simbiosis Vegetal. Museo de Historia Natural. UNMSM.

Av. Arenales 1256. Apartado 14-0434. Lima 14. PERU. haydmon@yahoo.com

Resumen

La costa desértica del territorio Peruano posee humedales peculiares como lagunas superficiales, las que evaluadas de norte a sur fueron: Las Salinas de Chimbote, Villa Maria, Las Salinas de Huacho, Ventanilla, Villa y Puerto Viejo. Colecciones algales estándar con registros de parámetros físico-químicos (pH, salinidad: NaCl, temperatura, fosfatos y nitratos) de las lagunas fueron realizados irregularmente entre 1985 y 2006. El aislamiento y cultivo unialgal de la prasinofita *Tetraselmis contracta* así como la velocidad de crecimiento fue realizado en medio ASP6 enriquecido. Las lagunas evaluadas están expuestas a un régimen hídrico anual fluctuante durante los periodos de inundación y desecación llegando a formar costras salinas. El rango de pH estuvo entre 6.5 y 10.5 y la temperatura entre 17 y 39°C. La estructura de las comunidades fitoplanctónicas estuvo representada por *T. contracta* asociada con *Aphanothece halophytica*, *Prorocentrum cassubicum*, *Oscillatoria tenuis*, *Spirulina subsalsa*, *Dunaliella viridis*, *Chlorella* sp. y diatomeas halófilas. La plasticidad fenotípica de *Tetraselmis contracta* esta relacionada con sus adaptaciones estratégicas durante la alternancia de generaciones del ciclo de vida con fases planctónica y bentónica. La distribución de *T. contracta* exhibió un rango de tolerancia con gradiente polieurihalina (5-155 ppm) que aunada a sus estrategias de sobrevivencia (estados de resistencia) en condiciones inestables ha permitido su colonización exitosa en las lagunas costeras.

Palabras clave: Tetraflagelado, estado de resistencia, germinación, plasticidad, quiste.

Abstract

The desert coastal of Peruvian land has peculiar wetlands such as the evaluated shallow lagoons which are from north to south as follows: Las Salinas de Chimbote, Villa Maria, Las Salinas de Huacho, Ventanilla, Villa and Puerto Viejo. Standard algal collection with the physical - chemical parameters (pH, salinity: NaCl, temperature, phosphate, nitrate) of the lagoons were registered irregularly between 1985-2006. The isolation and unialgal culture of the prasinophyte *Tetraselmis contracta* as well as its growth rate were obtained with the enriched ASP6 medium. Evaluated lagoons were related to the fluctuating hydric regime during the flooding and desiccation periods with saline crust formation. The pH range was between 6.5 and 10.5 and, the temperature from 17 to 39°C. Planktic community structure with *T. contracta* was asociated with *Aphanothece halophytica*, *Prorocentrum cassubicum*, *Oscillatoria tenuis*, *Spirulina subsalsa*, *Dunaliella viridis*, *Chlorella* sp. and halophilic diatoms. *T. contracta* phenotypic plasticity is showed through its adaptive strategies, which have evolved an alternation of generations, between planktic and benthic phases of its life cycle. *T. contracta* distribution according to salinity tolerance range showed its poly-euryhaline gradient (5-155 ppt), and its strategies to survive under unstable conditions to support the success colonization at the coastal wetlands.

key words: Tetraflagellate, resting stages, germination, plasticity, cyst.

Introducción

En Sudamérica, la costa desértica del Pacífico Peruano posee lagunas tropicales similares a las

distribuidas en otras regiones áridas del mundo. Estos ecosistemas acuáticos talasohalinos y atalasohalinos constituyen corredores biológicos siendo habitados por

aves locales y migratorias. En la costa Peruana, lagunas como las de Chilca y Huacho en el Departamento de Lima y las de Caucato y Otuma en el departamento de Ica tienen semejanza con lagunas salinas del mundo donde predominan *Artemia sp.* según Sorgeloos (1980).

Las comunidades fitoplanctónicas dominan los ecosistemas pelágicos que constituyen el 70% del área superficial mundial (Reynolds, 2006). Las microalgas están consideradas como los productores más prolíficos de la biomasa vegetal con eficientes sistemas fotosintéticos, siendo responsables de mas de la mitad de la producción primaria total mundial (Andersen, 1998; Wetzel, 2001). Ellas colonizan una variedad de ecosistemas acuáticos, terrestres y aéreos siendo su éxito relacionado con la diversidad de roles funcionales en la biosfera. En nuestro país tenemos datos referenciales de especies algales y las condiciones físico-químicas de las aguas de estos ecosistemas acuáticos reportados por Acleto (1966), Maldonado (1943), Chacón (1980), Montoya & Golubic (1991) y Montoya (2009).

Las Prasinophyceae constituyen un grupo de microalgas peculiares que reflejan su diversificación evolutiva (Norris, 1980; Sym & Peinar, 1993; Graham & Wilcox, 2000). Las prasinofitas unicelulares son consideradas ancestros de las algas verdes y de las embriofitas (Viridiplantae) poseen una considerable heterogeneidad morfológica, ultraestructural y bioquímica que avala a las prasinofitas como grupo parafilético con estados de enquistamiento, aunque el proceso de formación de quistes y su germinación es poco conocida con excepción de lo registrado para los géneros *Platymonas* y *Prasinocladus* (Kobara & Hori 1975; Cavalier-Smith 1981; Fawley *et al.*, 2000). *Tetraselmis* Stein (Prasinophyceae, Tetraselmidaceae) constituye un fitoflagelado ancestral muy utilizado en el campo de la acuicultura por los requerimientos nutricionales siendo fuente de ácidos grasos esenciales y aminoácidos para los invertebrados como rotíferos y estadios larvales de crustáceos, moluscos, y peces por lo cual es producida en cultivos en masa. Especies como *T. suecica* (Kylin) Butcher y *T. chui* Butcher han sido criopreservadas con altos niveles de viabilidad

para su empleo en acuicultura constituyendo fuente de alimento microalgal vivo y seco como partículas microencapsuladas (Helm & Laing 1981, Day & Fenwick 1993). Los objetivos de la presente investigación fueron evaluar la colonización de *Tetraselmis contracta* (N. Carter) Butcher en diferentes lagunas costeras, relacionar su distribución con la calidad de las aguas que tipifica así como identificar los estadios de su ciclo de vida en la naturaleza y en cultivo relacionados con su distribución en los humedales costeros.

Materiales y métodos

Los humedales costeros del Departamento de Lima como las lagunas de Puerto Viejo, Villa, Ventanilla y Las Salinas de Huacho y los del Departamento de Ancash como la laguna Las Salinas y la laguna de Villa Maria en Chimbote fueron evaluados. Colecciones algales estándar de comunidades fitoplanctónicas (Aqua-Net 15 μ m) y bentónicas así como el registro de los parámetros físico - químicos (pH, salinidad, temperatura, fosfato, nitratos) fueron registrados irregularmente entre 1985 y el 2006. Submuestras de las diferentes comunidades fueron fijadas y preservadas en formalina al 5% y lugol. La salinidad fue registrada utilizando un salinómetro American Optical T/C (NaCl). El pH fue determinado mediante indicadores neutralit y alcalit. Los fosfatos (iones ortofosfato) fueron medidos como mg L⁻¹ mediante cintas analíticas (Merck) y los nitratos fueron detectados por el test para nitratos de La Motte (model NCR) en mg L⁻¹.

El aislamiento y cultivo unialgal de la cepa de *T. contracta* de Las Salinas de Huacho fue obtenida en medio ASP6 enriquecido con glutamato de sodio (Provasoli *et al.*, 1957; Lewin & Lee 1985). Los cultivos fueron mantenidos a una temperatura de 21°C y un régimen de fotoperiodo de 16/8. La identificación de la morfoespecie así como de las microfotografías secuenciales de los estados vegetativos y reproductivos de las diferentes cepas fueron realizados según bibliografía especializada (Butcher, 1959; Norris *et al.*, 1980; Hori *et al.*, 1982;

Sym & Peinar (1993). El crecimiento algal y el

tiempo de generación fueron estimados de la densidad celular en función del tiempo, lo cual se obtuvo por conteo celular (células por mililitro) con 3 réplicas mediante un hematocitómetro. La velocidad de crecimiento fue expresado en divisiones por día $k = [3.322 / (t_2 - t_1)] (\log N_2 / N_1)$ y el tiempo de generación Td (h/div.) fue calculado a partir de k . (Guillard, 1973, 1975; Woods *et al.*, 2005).

La distribución algal de acuerdo a la tolerancia a la salinidad fue establecida según el Sistema de Venice (Sil 1959) en adición a la clasificación de Golubic (1980) y Albrecht (1984).

Resultados

I. Área de Estudio y Comunidades Algales

En el litoral costero occidental de Sudamérica se extiende el desierto tropical que es interrumpido por las lagunas costeras, ríos que descienden por las estribaciones de la Cordillera de los Andes Occidentales, así como algunos manantiales o puquiales. Las lagunas evaluadas están expuestas a un régimen hidrológico anual con periodos de inundación en otoño (mayo, junio) hasta primavera (fines de octubre o comienzos de noviembre) y periodos de sequia (fines de primavera, verano e inicios de otoño). Las lagunas de norte a sur son:

Laguna Las Salinas de Chimbote, ubicada en el Departamento de Ancash entre las coordenadas de 9°20' LS y 78°26' LO, aproximadamente a 33 km al sur de la ciudad de Chimbote. Esta laguna corresponde a un ecosistema talasohalino con aguas provenientes de la filtración de aguas marinas de la Playa Salinas localizada aproximadamente a 300 m. La salinidad de sus aguas oscila entre los 35 ppm (lado sur-este) hasta la saturación (lado norte) por lo cual se le considera en la categoría de mesohalina (35 – 50 ppm) e hipersalina (>50 ppm) según Hammer *et al.* (1983). El rango de pH estuvo entre 6.5 y 9 y la temperatura osciló entre los 18 y 33°C en otoño.

Las floraciones de *T. contracta* se presentaron como películas planctónicas verdosas o verde parduscas en

orillas de la laguna y en pozas aledañas, con rango de salinidad entre los 95 y 110 ppm y el rango de pH entre 8.5 y 9 en otoño (fines de marzo e inicios de mayo). Las floraciones mixtas con *T. contracta* estuvieron asociadas principalmente con las cianobacterias *Aphanothece halophytica*, *Pleurocapsa entophysaloides* y diatomeas halófilas.

Laguna Villa Maria, localizada en el Departamento de Ancash, provincia del Santa, al sur de la ciudad de Chimbote, entre las coordenadas de 9°06' LS y 78°32' LO, a la altura del 421 km de la Panamericana Norte y próxima al cauce del río Lacramarca. Esta laguna y los cuerpos de agua aledaños (acequias, pozas, charcas) son formados por las aguas de filtración del subsuelo proveniente del río Lacramarca y las aguas de irrigación de campos de cultivos aledaños (Tangay, Los Álamos). Las aguas registraron un rango de salinidad entre 10 y 250 (290) ppm y el pH osciló entre 6 y 8. (Fig.1).

Las floraciones planctónicas de *T. contracta* forman masas verdosas, verde amarillentas o verde parduscas o diseminadas se presentaron en hábitats con salinidades entre 18 a 60 ppm y rango de pH entre 6.5 y 8. Las floraciones de *T. contracta* dominaron en zonas de la laguna, charcas y pozas con materia orgánica provenientes de restos de la cosecha de macrófitas como el totoral y excrementos de aves formando natas verde parduscas espumosas flotantes, algunas de las cuales forman bandas en las orillas por efecto del viento. *T. contracta* se presentó asociada con *Euglena gracilis*, *Prorocentrum cassubicum*, *Oscillatoria tenuis*, *O. princeps*, *Spirulina subsalsa* y diatomeas.

Laguna Las Salinas de Huacho, ubicada en Departamento de Lima entre las coordenadas de 11°10' LS y 77°30' LO, aproximadamente a 110 km al norte de la ciudad de Lima. Este humedal talasohalino comprende lagunas en su mayoría superficiales y permanentes, pozas, charcas con aguas provenientes de la filtración de aguas marinas. Las frecuentes fluctuaciones en el nivel de agua se evidencia en el rango de profundidad que oscila entre 0.5 y 2.5 m. En verano se reduce drásticamente el nivel de la columna de agua formándose pozas y charcas en el litoral lagunar y llegando la mayoría de las orillas a la desecación

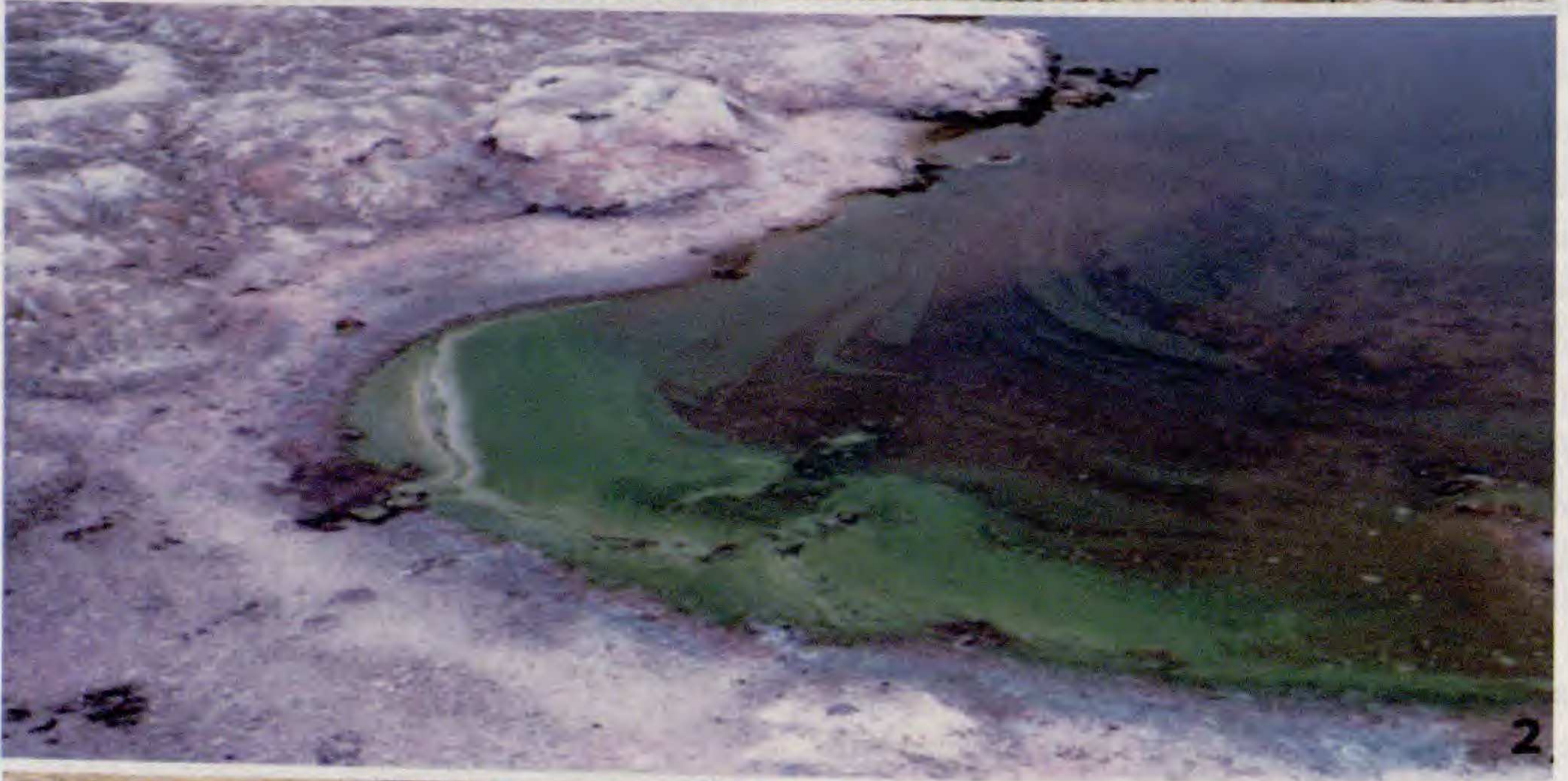


Fig. 1. Vista panorámica de la laguna Villa Maria en el desierto costero del Departamento de Ancash; **Fig. 2.** Orilla de laguna Las Salinas del Huacho con costras salinas y floraciones de la microalga *Tetraselmis contracta* en verano; **Fig. 3.** Vista próxima de poza de laguna Grande de Puerto Viejo con natas flotantes pardo amarillentas desprendidas del lecho lagunar (previamente desecado) conteniendo estadios de resistencia de *T. contracta*.

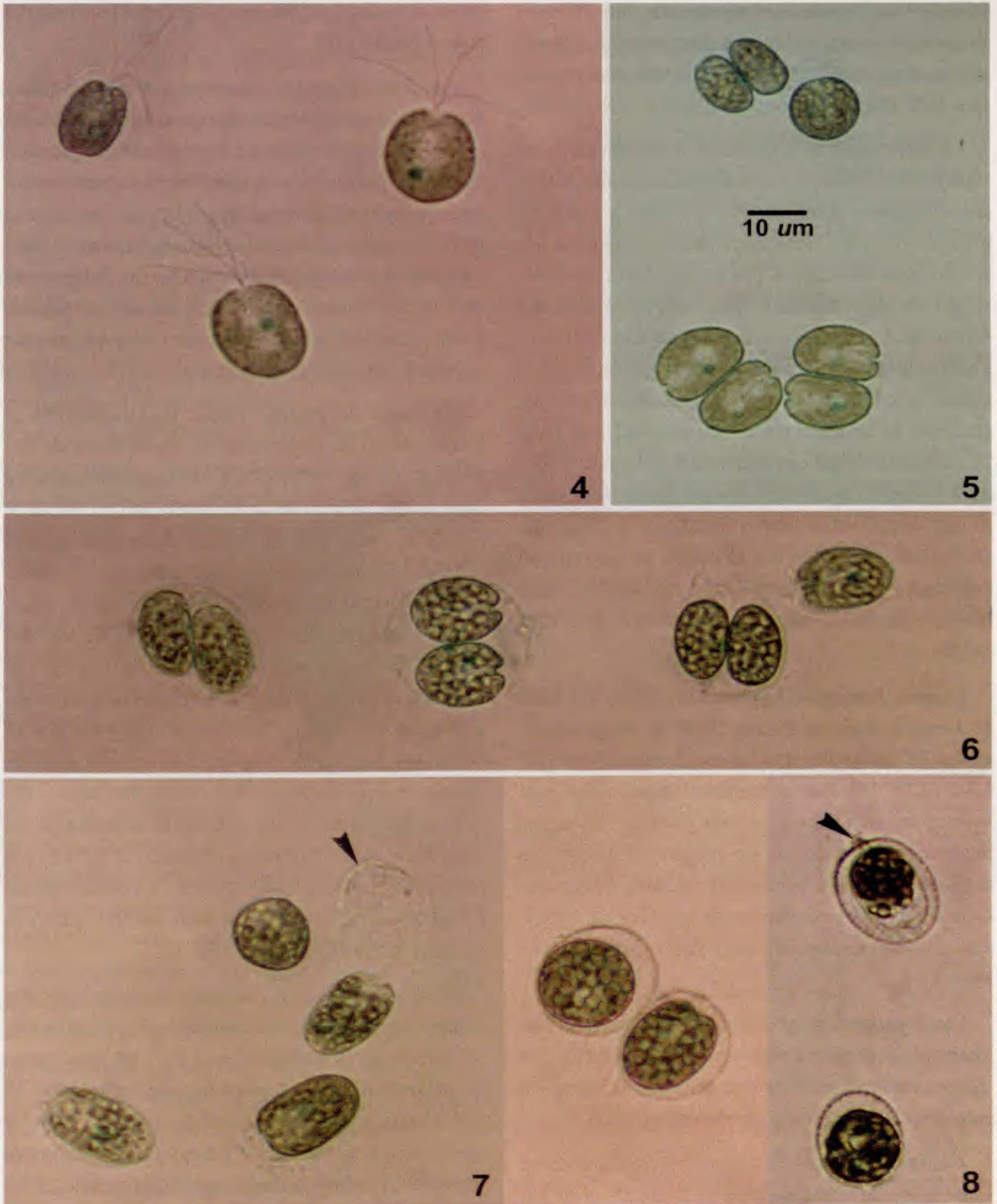


Fig. 4. Células tetraflageladas de *T. contracta*; **Fig. 5.** Célula libre redondeada (parte superior) con par de células recientemente divididas dentro de teca parental. Parte inferior con formación de dos pares de células hijas distribuidas en forma invertida dentro de cada teca parental; **Fig. 6.** Células hijas en pares (3) rodeadas de teca parental, la del centro con células hijas orientadas en la misma dirección y depresión apical conspicua. Parte superior derecha con célula libre; **Fig. 7.** Células libres aflageladas y resto de pared celular (flecha); **Fig. 8.** Formación de las células latentes con contenido celular gradualmente contraído y teca parental ornamentada. Célula con proyección papilar apical (flecha). Escala en Fig.5 valida para Figs. 4, 6 - 8.

parcial o total. La salinidad estuvo entre 80 y 280 ppm alcanzando la saturación con formación de costras salinas, el pH osciló entre 6.5 y 8 y la temperatura entre 18 y 36°C (Fig. 2).

Las floraciones de *T. contracta* formando películas superficiales delgadas o densas colonizaron hábitats con salinidades entre los 88 y 155 ppm y rango de pH entre 6.5 y 8. Floraciones mixtas dominadas por *T. contracta* coexistieron con las halófitas *Dunaliella viridis*, *Oscillatoria tenuis*, *Aphanothece halophytica* y diatomeas. Las floraciones densas en verano (febrero) a orillas de la laguna y pozas con fertilización orgánica natural (excremento de aves) se presentaron con una gradiente de salinidad entre los 100 y 145 ppm (Fig. 2). La sucesión algal con decadencia de las floraciones de *T. contracta* fue evidenciada por poblaciones verde pálidas dispuestas en franjas espumosas al haber sido acarreadas a las orillas por el viento, en hábitats con salinidades oscilando entre 145 y 155 ppm en otoño (fines de marzo) y rango de temperatura entre 22 y 34°C.

Laguna Ventanilla, localizada al norte de la ciudad de Lima, a la altura del km 12 de la carretera a la ciudad de Ventanilla entre las coordenadas de 11° 52' LS y 77°08' LO. Este ecosistema lagunar comprende lagunas de aguas dulces, salobres y salinas. La laguna talasohalina del lado sur (en relación al desvío que conduce a la Playa Ventanilla) presenta salinidades entre los 6 y 150 ppm alcanzando la saturación (NaCl) con formación de costras salinas. El rango de pH osciló entre 7 y 8.7.

Las floraciones de *T. contracta* en las laguna de Ventanilla hipersalina formaron masas planctónicas densas, verde amarillentas, en gradiente de salinidad entre 65 y 70 ppm y rango de pH entre 8 y 8.5.

Laguna Villa, localizada en el Departamento de Lima entre las coordenadas de 12°12' LS y 76°59' LO. El sistema hídrico se origina principalmente por las aguas freáticas provenientes de las filtraciones del río Surco que constituye un ramal del río Rímac y filtraciones de agua marina. Este ecosistema lagunar comprende lagunas superficiales donde la salinidad

osciló entre los 0 y 194 ppm y el rango de pH estuvo entre 6.8 y 9.5 (10).

Las floraciones de *T. contracta* formaron masas suspendidas verde amarillentas o pardo amarillentas. En pozas permanentes (Hípico), la prasinofita se presentó asociada con *Chlorella sp.* y diatomeas en hábitats con rango de salinidades entre 38 y 54 ppm. Floraciones mixtas también colonizaron hábitats hipersalinos (100–122 ppm) con rango de pH entre 8.6 y 10. Poblaciones de *T. contracta* coexistieron con *Aphanothece stagnina* y *Oscillatoria formosa* en pozas con gradiente de salinidad entre 130 y 142 ppm y pH de 9.5.

Lagunas de Puerto Viejo, localizadas en el Departamento de Lima, entre las coordenadas de 12° 33'–12° 34' LS y 76°41'–76°42' LO, aproximadamente entre el km 70 y 73 de la Panamericana, al sur de la ciudad de Lima. Este ecosistema comprende lagunas atalásicas superficiales (laguna Grande) con un sistema hidrológico proveniente de la percolación de las aguas subterráneas (acuíferos) de las cuencas de los ríos Chilca y Mala así como de los canales de irrigación de San Andrés (Valle de Mala) principalmente en otoño e invierno. La etapa de inundación es seguida por un periodo prolongado de evaporación con desecación de algunos cuerpos de agua a fines de verano, inicios del otoño y fines de primavera. El rango de salinidad estuvo entre 0 y 90 ppm, el pH osciló entre 6.5 y 8.5 (10.5) y la temperatura estuvo entre 17 y 39°C. La concentración de fosfatos registrada alcanzó hasta los 50 mg.L⁻¹ y la de nitratos hasta 0,88 mg.L⁻¹ (Fig.3).

Las floraciones de *T. contracta* formaron películas superficiales densas, verde amarillentas y espumosas, en hábitats con salinidades entre 5– y 90 ppm, rango de pH entre 6.5 y 10.5, rango de temperatura entre 17 y 39°C, concentraciones de fosfatos hasta 10 mg.L⁻¹ y de nitratos hasta 0,88 mg.L⁻¹. Las poblaciones naturales fueron favorecidas por altas temperaturas (verano, otoño y primavera) así como por la fertilización orgánica natural (heces de aves, ganado). *T. contracta* estuvo asociada principalmente con *Prorocentrum cassubicum*, *Euglena gracilis*, *Dunaliella viridis* y *Campylodiscus sp.* entre otras diatomeas.

II. Área de Estudio y Comunidades Algales

T. contracta es una prasinofita unicelular planctónica con células vegetativas libres, tetraflageladas, ovoides, elipsoidales u ovoide elongadas. Parte anterior con 4 lóbulos redondeados y una depresión apical en forma de “v” que alcanza de 2.7 a 4.3 μm de longitud y por donde emergen los flagelos. El extremo anterior desarrolla una proyección en forma de papila en algunos casos, que corresponde a la evaginación de la depresión apical. Vista apical ovoide, ligeramente comprimida con extremos laterales redondeados y donde se distribuyen los flagelos simétricamente en pares. Células asimétricas en vista lateral, exhibiendo forma ovoide con un borde lateral casi recto y extremo posterior gradualmente atenuado, agudo o redondeado y ligeramente curvado. Esta característica se atribuye a la mutua compresión celular durante la formación de las células hijas en el interior de la célula parental. Teca o pared celular rígida, ornamentada, incolora o amarilla pálida. Cloroplasto laminar parietal en forma de copa, profundamente curvado y ligeramente tetralobulado en su parte anterior, verde brillante o verde amarillento. El cloroplasto se presenta uniforme en células vegetativas jóvenes llegando a ser granuloso en células adultas o viejas por acumulación de las sustancias de reserva. Pirenoide prominente, hemisférico o reniforme, de posición basal, central o subcentral, generalmente posterior en células jóvenes recién emergentes (germinación), alcanzando hasta 5.4 μm de diámetro. Estigma localizado en la zona central o ligeramente anterior, de forma redondeada o lenticular, anaranjado o rojo brillante, de 1.5 a 2 μm de diámetro. Reproducción frecuente por fisión. Las dimensiones celulares alcanzaron de (4.3) 7.5 – 19.3 μm de diámetro, de (7) 8.6 – 25.7 μm de longitud y de 8.6 – 12 μm de espesor. La longitud flagelar estuvo entre 14 y 21.4 μm , que constituye aproximadamente las $\frac{3}{4}$ partes de la longitud celular. (Figs. 4-5).

III. Crecimiento y estrategias del ciclo de vida

El crecimiento algal y las estrategias reproductivas de las fases planctónica y bentónica en poblaciones naturales de *T. contracta* complementadas con los cultivos unialgales permite establecer el desarrollo

del ciclo de vida con alternancia de generaciones. Esta microalga se reproduce principalmente en forma asexual, donde una célula origina dos células hijas aparentemente idénticas, las dos células hijas a su vez forman 4 células y así en forma sucesiva se produce el crecimiento y proliferación de la población microalgal. La cepa de *T. contracta* de las Salinas de Huacho con células libres en la naturaleza o en la fase exponencial, se reproduce por fisión. Las células retienen sus flagelos cuando la fisión ha empezado o llegan a ser inmóviles después de liberarlos. El plano de división longitudinal vertical u oblicuo fue inicialmente reconocido por la incisión anterior que se profundiza hasta alcanzar el extremo posterior de la célula. El estigma se duplica simultáneamente. Las células hijas con los flagelos formados pueden rotar en el interior de la teca parental, ellas pueden estar en posición invertida en relación una con otra y en algunas excepciones permanecer en la misma dirección hasta su liberación (Figs. 5 -7, 17a).

La velocidad de crecimiento de la cepa de Las Salinas de Huacho fue de 0.97 divisiones por día y el tiempo de generación fue de 24.7 h div⁻¹.

Formación de células latentes y reactivación

En poblaciones naturales, los estados de latencia se formaron a partir de las células vegetativas como parte del ciclo de vida. Las células latentes constituyen células vegetativas aflageladas, ovoides o redondeadas, de (11.7) 12.5 a 17.5 (24.6) μm de diámetro. Ellas presentan una pared celular gruesa, ornamentada, incolora, amarilla pálida o pardo clara. El contenido celular de las células latentes se contrae y adquiere gradualmente forma redondeada en diferentes grados según su desarrollo. Contenido celular granuloso, denso, ligeramente pardusco o verde pardusco. En algunos casos se forma una pared adicional alrededor del contenido celular contraído. Algunas células latentes presentan una proyección como papila anterior ó depresión apical conspicua. Además otras células latentes pueden permanecer dentro de la teca parental expandida que alcanza forma redondeada u ovoide. Durante la etapa final de la fase exponencial e inicios de la estacionaria (aproximadamente 10 días de cultivo) se formaron células latentes inmóviles al liberar los

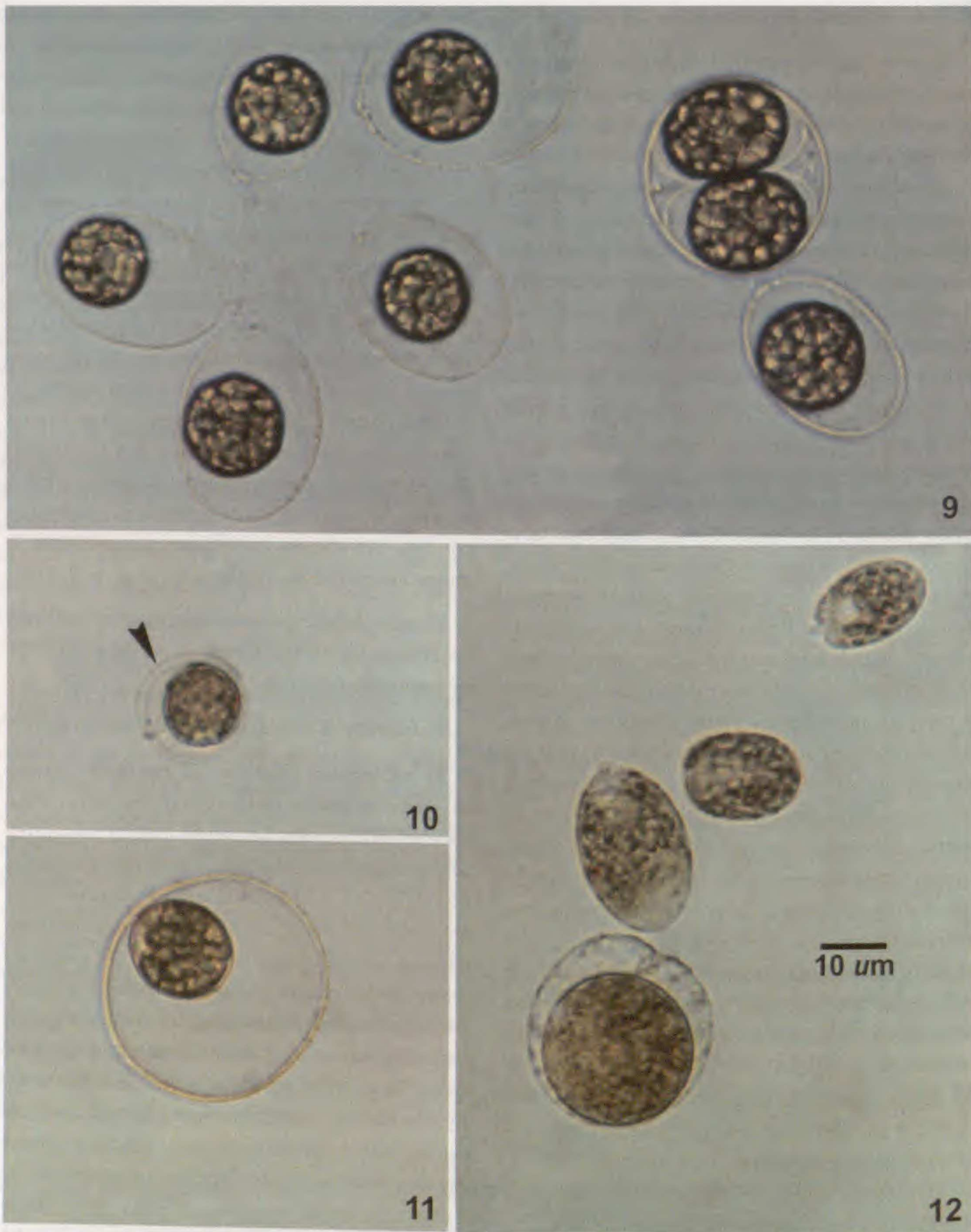


Fig. 9. Población de *T. contracta* con células en estado de latencia con diversos grados de desarrollo. La mayoría de origen unicelular exhibiendo la papila apical, con excepción de célula parental con dos células hijas que se diferencian en células latentes en el interior de las tecas. Contenido celular granulado por acumulación del material de reserva; **Fig. 10.** Célula latente con doble pared celular (flecha); **Fig. 11.** Célula latente con pared celular hinchada; **Fig. 12.** Células libres aflageladas (3) y célula latente redondeada (parte inferior). Escala en Fig.12 válida para Figs. 9 - 11.

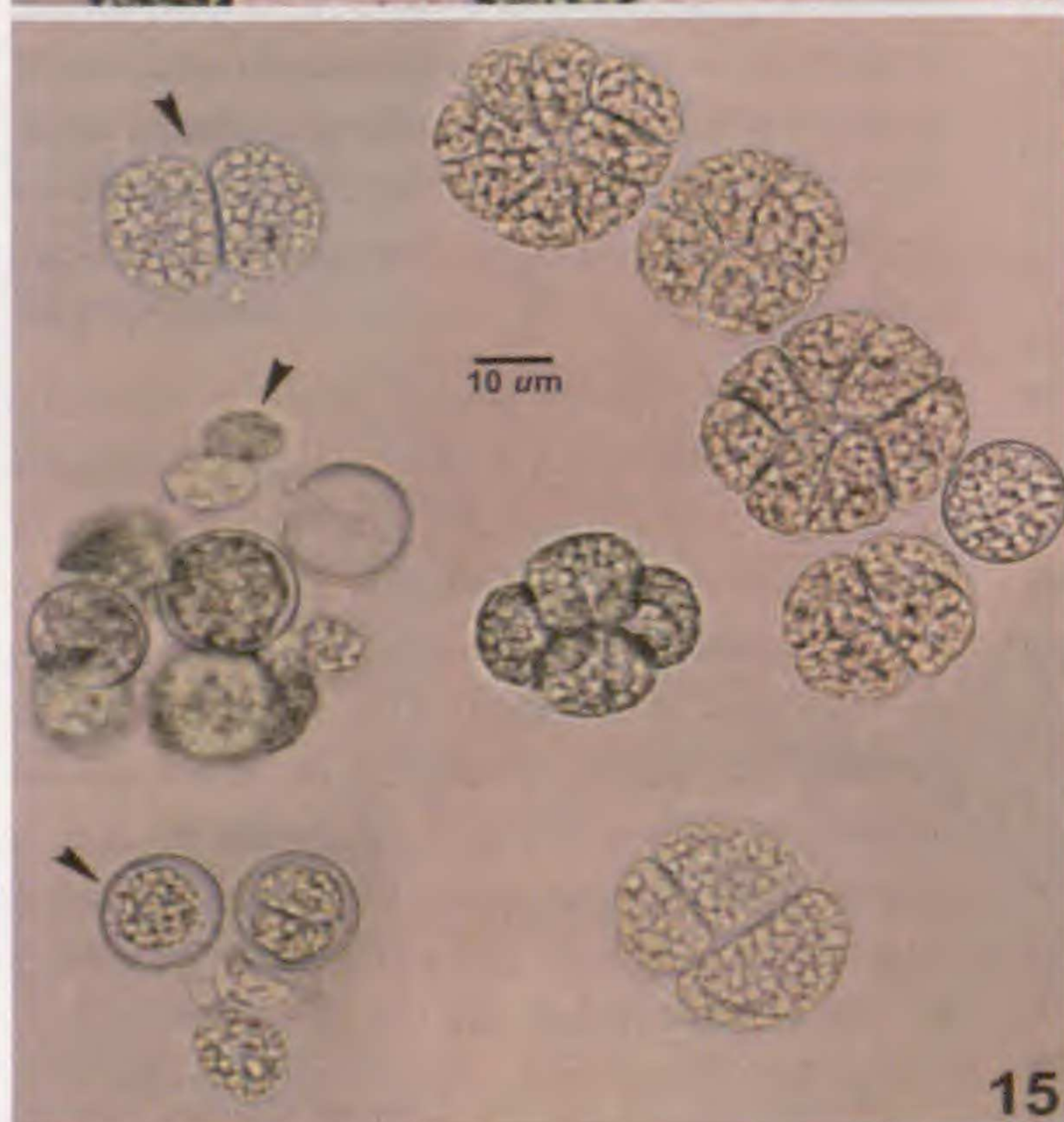
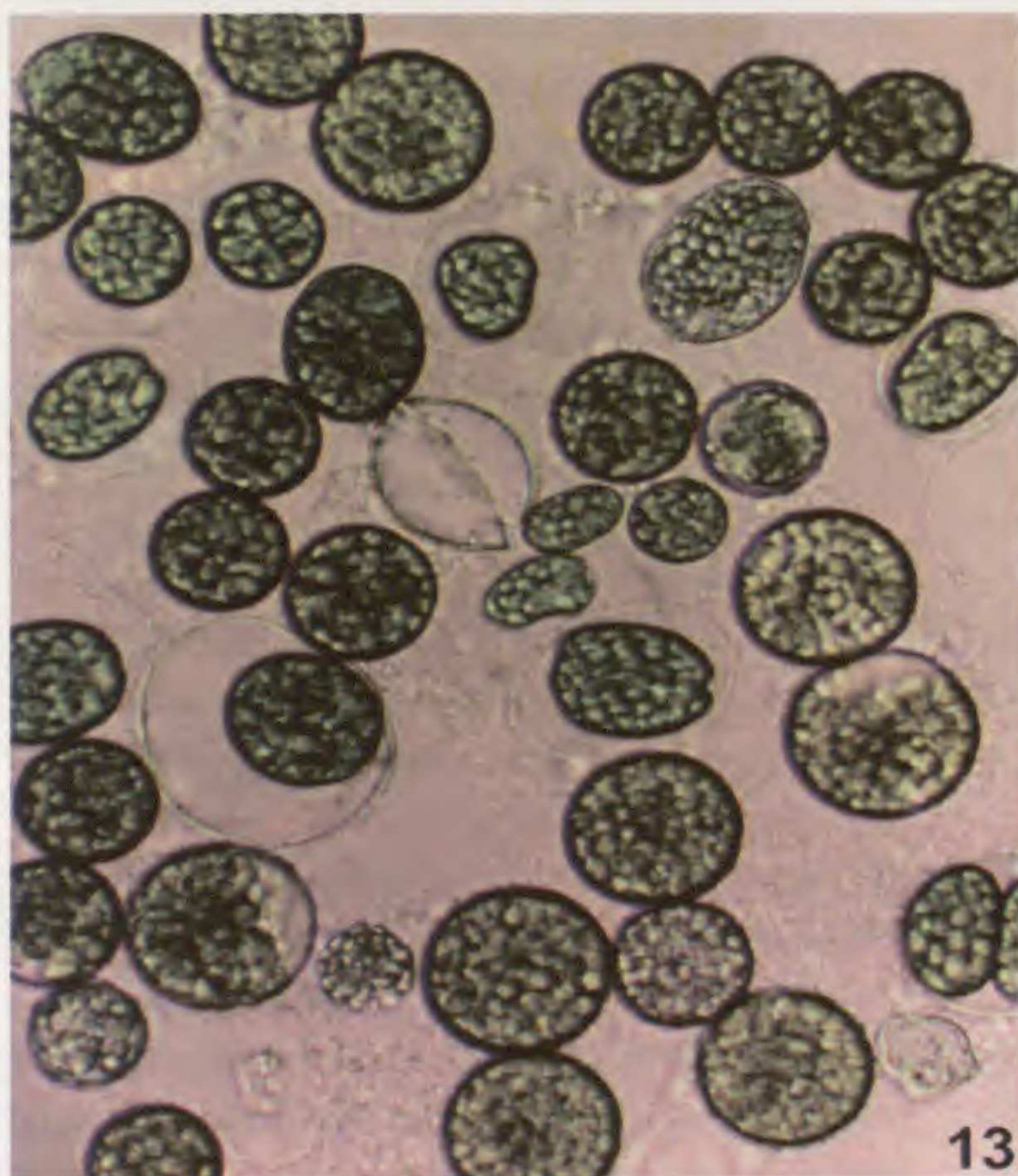


Fig. 13. Población de *T. contracta* con células latentes y su transición hacia la formación de quistes; **Fig. 14.** Quistes esféricos aislados y agregados en diversos grados de desarrollo; **Fig. 15.** Quistes aislados y germinación de quistes con liberación de células aisladas o de grupos celulares (hasta 8 células) dentro de una membrana (flecha en parte superior izquierda) provenientes de divisiones consecutivas del quiste; **Fig. 16.** Parte superior con formación de quistes compuestos y aislados a partir de células liberadas por germinación de quistes y desarrollo de pared quística ornamentada. Grupo celular rodeado de membrana celular liberado durante la germinación del quiste (parte inferior). Célula adyacente también germinada a partir de quiste aislado. Escala en Fig.14 válida para Fig. 13.

flagelos, quedando aisladas o en pares según su origen. Las células latentes en pares, de tamaños diferentes o semejantes fueron formados a partir de células hijas diferentes o semejantes en tamaño, dentro de la teca parental. La célula parental con células latentes hijas alcanzaron una longitud de 18.2 a 27 (32) μm .

En cultivos, la reactivación de las células latentes ocurrió con la adición de medio de cultivo fresco en dos modalidades: La primera, en la cual se produce una elongación celular dentro de la pared celular hasta alcanzar el tamaño normal de las células vegetativas, seguido por la regeneración de flagelos para su liberación. La segunda, incluye un patrón de división en la célula latente activada con la formación de dos células hijas flageladas. En ambas formas, las células activadas o recién formadas fueron liberadas dentro de una membrana envolvente (saco) después del rompimiento o desintegración de la pared celular de la célula latente inicial. Posteriormente, las células reactivadas y móviles fueron liberadas de la membrana. (Figs. 8-13).

En la naturaleza, las células latentes, aisladas o en pares dentro de la teca parental también fueron reactivadas y liberadas como células motiles al inicio del periodo de inundación (otoño). Sin embargo, el estrés hídrico durante el periodo de sequia que acarrea el descenso del nivel de agua por evaporación a partir de la primavera (octubre) aunado a la fuerza del viento induce nuevamente la formación de células latentes que alcanzaron mayores dimensiones bajo condiciones de gradiente de salinidad entre 10 y 15 ppm y rango de pH entre 7.5 y 8.5. (Fig. 17b).

Formación de quistes y germinación

Los quistes constituyen células de resistencia formados en respuesta a condiciones desfavorables por lo cual la pared es resistente al medio circundante. La formación inicial del quiste fue reconocida por la contracción del contenido celular seguido por la formación y el engrosamiento de la pared quística. Algunos quistes pueden permanecer intracelularmente (dentro de la teca parental) durante su desarrollo mientras que otros llegan a aislarse cuando se desintegra la teca parental. La formación de quistes a partir de las

células latentes fue observado en cultivos viejos (10-20 días) donde el incremento del tamaño del quiste con acumulación de material de reserva y el engrosamiento de la pared quística fue seguido de la ruptura de la teca parental. Los quistes en la naturaleza fueron formados de células latentes maduras bajo condiciones de salinidad entre 8 y 90 ppm y rango de pH entre 8 y 10.5. (Figs. 13-16).

Se reconocieron quistes simples y compuestos. Los quistes simples son esféricos, ovoides o ligeramente compresos lateralmente, de contenido celular granular, verde oscuro, verde pardusco o pardo amarillento. Pared del quiste gruesa, ornamentada, parduzca pálida, pardo anaranjada o pardo dorada, con un espesor entre 0.75 y 1.3 μm . Los quistes simples alcanzaron de 8 a 19.3 (25) μm de diámetro y de 21.4 a 22.5 μm de longitud. Los quistes compuestos (2-8) fueron formados dentro de la teca parental después de una o varias divisiones celulares. Cada célula latente desarrollo una pared gruesa formando quistes (2-8) dentro de la teca parental. Posteriormente, la desintegración de la teca celular favoreció la liberación de los quistes compuestos (2). Algunos quistes permanecen dentro de la teca parental durante su desarrollo, otros se aíslan cuando la pared se desintegra.

Los quistes aislados pueden dividir su contenido produciendo dos células hijas y antes de ser liberadas de la teca parental desarrollan su propia pared transformándose posteriormente en quistes compuestos (2). Estos quistes ovoides elongados alcanzan de (9.6) 17 – 20.3 μm in diámetro y (16) 19.3- 26.8 μm de longitud. Los quistes compuestos (4), con 4 quistes internos ovoides o redondeados dentro de la teca parental formados por previas y sucesivas divisiones celulares, alcanzaron de 23.5 a 26.8 μm de diámetro y de 27.8 a 31 μm de longitud.

En cultivos, la germinación de quistes ocurrió después de 48 horas de adicionarle medio de cultivo, con la separación inicial del contenido celular del quiste de la pared quística. Esta célula reactivada y rodeada de una membrana hialina o amarilla pálida fue liberada a través de la ruptura de la pared quística. El proceso de germinación duró una semana hasta la liberación de

poblaciones naturales así como su activación y germinación *in situ* de quistes demostró su habilidad para sobrevivir periodos de estrés ambiental del desierto costero. Los estados de resistencia como parte del ciclo de vida constituyen poblaciones de refugio para la recolonización microalgal. El crecimiento de esta microalga con patrones distribucionales heterogéneos (plancton, bentos) ilustra su dinámica poblacional y estrategias reproductivas en condiciones de inestabilidad que alcanza estados de desecación. La tolerancia de la especie a la desecación fue reconocida *in situ* donde con los estadios bénticos latentes (quistes) en las costras salinas del litoral lacustre desecado o en lechos lagunares expuestos. Los quistes capacitados para resistir cambios extremos del medio circundante y con una velocidad metabólica reducida constituyen vectores significantes de transporte de la especie en áreas locales y regionales manteniendo el potencial (inóculo) para retornar y florecer en condiciones favorables lo que avala la distribución y perennización de la especie.

La comprensión de los estadios del ciclo de vida de *T. contracta* con el proceso de formación de quistes (enquistamiento), su activación y germinación con el re-establecimiento de las células vegetativas permitió conocer el origen de la formación de sus floraciones algales y la sobrevivencia de esta especie en las lagunas costeras. En las diferentes poblaciones evaluadas de *T. contracta* como las cepas de Puerto Viejo y Villa Maria se reconocieron células vegetativas libres, células latentes y quistes. La formación de células latentes iniciada con la reducción del recurso hídrico estacional aunado a la fuerza del viento constituye una inducción del estrés para la especie a fines de primavera que se extiende durante el verano e inicios de otoño. Los quistes como células de resistencia del bentos desecado (costras salinas) del lecho lagunar, pozas o charcas, fueron reactivados a comienzos del periodo de inundación estacional. La formación de estados de resistencia (enquistamiento masivo) de *T. contracta* contribuye en forma significante al decline de las floraciones planctónicas e incrementa su resistencia a la predación por herbívoros.

El enquistamiento en otros grupos algales planctónicos (crisofitas, dinoflagelados, clorofitas, diatomeas) es inducido por variables físico químicas y biológicas como la concentración de nutrientes, iluminación, temperatura y densidad celular (Agbeti & Smol, 1995). Van den Hoff & Burton (1989) reportaron los quistes de la prasinofita unicelular *Pyramimonas gelidicola* Mc Fadden en lagos salinos de Vestfold Hills (3.2 -133 ppm de salinidad) y en los sedimentos del lago Ace, Antártica indicando su importancia en las áreas de la paleolimnología y taxonomía. Los quistes asexuales de *T. contracta* se diferencian de los quistes de origen sexual en dinoflagelados y el registro fósil sugiere que un gran numero de dinoflagelados pueden producir quistes (Blackburn & Parker 2005). La presencia de quistes de *T. contracta* en etapa de desecación de las lagunas asegura la viabilidad de la especie en condiciones extremas sin embargo existe un vacío sobre los restos quísticos en sedimentos lacustres.

Norris et al. (1980) diagramaron en forma parcial la historia de vida de la especie prasinofita pedunculada *Tetraselmis. ascus*. Tanoue & Aruga (1975) y Hori (1994) describieron para *Tetraselmis sp.* (como *Platymonas*) la formación de células temporal no motiles y de quistes. Los quistes los obtuvieron en la fase de estacionaria (6 - 8 semanas) en cultivos continuos y el proceso de germinación (exquistamiento) con medio fresco produjo la liberación de solo 4 células hijas. La germinación de los quistes de *T. contracta* con la liberación de un mayor número de células vegetativas se relaciona con la presencia de quistes simples y compuestos en la naturaleza y en cultivo. La comprensión de los factores ambientales responsables del enquistamiento de *T. contracta* en las lagunas evaluadas nos permite concluir que después de las floraciones, los cambios físico químicos del medio acuático que están relacionados con el periodo gradual de desecación favorecieron el estrés osmótico y el incremento de pH que inducen la formación de quistes. Estos resultados fueron avalados por estudios de cultivo con la formación de quistes dentro de un rango de salinidad entre 13 y 47.5 ppm y pH entre 9 y 9.5 (Tanoue & Aruga, 1975). Los cultivos de *T. contracta* en etapa final la fase exponencial y los cultivos viejos



Fig. 17. Estadíos del ciclo de vida de poblaciones naturales de *T. contracta*: a. Células libres flageladas y aflageladas, las oscuras de mayor tamaño han sido teñidas con lugol. b. Formación gradual de células latentes con pérdida de flagelos, contracción celular y transición hacia la formación de quistes. c. quistes aislados parduscos con pared celular engrosada y ornamentada. d. Germinación de quistes aislados con desintegración de la pared quística y gradual formación de flagelos.

(10 – 20 días) demostraron la formación de células latentes y posteriormente de los quistes.

La hidrodinámica en los humedales costeros, relacionada con diversos factores físico químicos acoplados a los intercambios en la columna de agua y dinámica de los flujos del seston, esta asociada con las floraciones del fitoplancton (Viner-Mozzini *et al.*, 2003, Oseguera *et al.*, 2010). Ellos son determinantes en la distribución de las especies algales que a su vez han desarrollado estrategias de aclimatación. En el caso de los fitoflagelados planctónicos como *T. contracta*, las unicélulas están expuestas a variaciones del espectro de radiación del fotoperiodo como resultado de los fenómenos de turbulencia (afloramiento estacionales, viento) frecuentes en lagunas costeras superficiales. La estructura de las comunidades algales evaluadas que forman natas o películas superficiales generalmente en verano puede relacionarse con la dinámica de respuestas de aclimatación a la intensidad luminosa, concentración iónica (pH) y salinidad, así como la carga de nutrientes en las lagunas costeras estimula la producción de biomasa algal. Las floraciones de *T. contracta* (cepa de P. Viejo) se presentan en diferentes periodos estacionales con un rango de salinidad entre 5 y 90 ppm y valores de pH entre 7.5 y 9.5 mientras que la cepa de Huacho florece en verano con rangos de salinidad mayores (100 y 145 ppm) y pH entre 6.5 y 8. Estas floraciones fueron estimuladas por la fertilización natural con materia orgánica como heces de aves, ganado, etc., así como el de macrófitas en descomposición como *Typha angustifolia*, *Schoenoplectus americanus*, *Bacopa monnieri*, *Ruppia maritima* y *Scirpus* sp. Por consiguiente, las variaciones ambientales y relaciones interespecíficas constituyen una presión evolutiva para optimizar la colonización algal como las floraciones mixtas de *T. contracta*, *D. viridis*, cianobacterias y diatomeas en humedales costeros.

Literatura citada

- Acleto, C.** 1966. Algas de agua dulce de las cascadas de Barranco. Publ. Museo Historia Natural. Serie B. 21:1 – 65.
- Agbeti, M. D. & J. P. Smol.** 1995. Chrysophyte population and encystment patterns in two Canadian lakes. J. Phycol. 31:70-78.
- Aguilar, C. S.** 1998. Crecimiento e historia de vida de *Dunaliella*

salina de las salinas de Los Chimus, Ancash y de Chilca, Lima, Perú. Anais do IV Congresso L

atino-Americano de Ficologia. Sociedad Ficológica da America Latina e Caribe. Brasil. 2: 309–324.

Albrecht J. 1984. Zur Autökologie ausgewählter Aufwuchsciliaten des WeserFluBsystems (Protozoa: Ciliophora). Decheniana 137: 132–167.

Andersen, R.A. 1998. Algal biodiversity, with remarks on the ecological and economic significance of algae. Anais do IV Congresso Latino-Americano de Ficologia. Sociedad Ficológica da America Latina e Caribe. Brasil. 1: 13-29.

Barberena C. & H. Montoya. 2009. Culture and life strategies of the microalga *Tetraselmis contracta* (N.Carter) Butcher at the central coastal lagoons in Lima, Peru. Verh. Internat. Verein. Limnol. Vol. 30. Part 8. 1293 - 1297 p. Stuttgart. Germany.

Blackburn, S. & N. Parker. 2005. Microalgal life cycles: excystment and encystment. In R.A. Andersen ed., Algal Culturing Techniques. 399 - 417 p. Phycological Society of America. Elsevier Academic Press.

Ben-Amotz, A. & M. Avron. 1983. Accumulation of metabolites by halotolerant algae and its industrial potential. Annual Review of Microbiology 37: 95–119.

Borowitzka, L. 1981. The microflora. Adaptation to life in extremely saline lakes. Hydrobiology 81:33-46.

Butcher, R. 1959. An introductory account of the smaller algae of British coastal waters. Part I. Introduction and Chlorophyceae. Fish. Investigations. London. 4: 1-74.

Chacón, G. R. 1980. *Chlorella peruviana* sp. nov. y su ambiente altamente alcalino. Bol. Soc. Peruana de Botánica. 8: 83-96.

Cavalier-Smith, T. 1981. The origin and early evolution of the eukaryotic cell. In Carlile, M. J., J.F. Collins & B.E. Moseley. eds. 33 - 84 p. Molecular and Cellular Aspects of Microbial Evolution. Cambridge University Press.

Day, J.G. & C. Fenwick. 1993. Cryopreservation of members of the genus *Tetraselmis* used in aquaculture. Aquaculture. 151-160.

Fawley, M. W., Y. Yun & M. Qin. 2000. Phylogenetic analyses of 18S rDNA sequences reveal a new coccoid lineage of the Prasinophyceae (Chlorophyta). J. Phycol. 36: 387-393.

Golubic, S. 1980. Halophily and halotolerance in cyanophytes. Origins of Life 10: 169- 183.

Graham, L. E. & L. W. Wilcox. 2000. Algae. Prentice Hall Inc. NJ. 397- 419p.

Guillard, R. 1973. Methods for microflagellates and nanoplankton, In J. R. Stein. ed. Handbook of Phycological Methods. Cultures methods and growth measurements. 69–58 p. Cambridge University Press.

Guillard, R. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine

- invertebrates, *In* W.L. Smith & M.H. Chanley. eds. Culture Marine Invertebrate Animals. 29–60 p. Plenum Press.
- Hammer, U.T; J. Shames & R.C. Haynes.** 1983. The distribution and abundance of algae in saline lakes of Saskatchewan, Canada. *Hydrobiologia* 105: 1–26.
- Helm, M. M & I. Laing.** 1981. Cost effective culture of marine unicellular algae. *In* Energy Conservation and use of renewable energies in the bio-industries. F. Vogt. ed. 247-259 p. Pergamon Press Oxford and New York.
- Hori, T., R.E. Norris & M. Chihara.** 1982. Studies on the ultrastructure and taxonomy of the genus *Tetraselmis* (Prasinophyceae) I. Subgenus *Tetraselmis*. *Bot. Mag. Tokyo* 95: 49 - 61.
- Hori, T.** 1994. An illustrated Atlas of life history of algae. Green Algae. Uchida Rokakuho Publ. Tokyo.
- Irianto, A. & B. Austin.** 2002. Probiotics in Aquaculture. *J. of Fish Diseases* 25:633-642.
- Javor, B.** 1989. Hypersaline Environments. Microbiology and Biochemistry. Springer– Verlag.
- Kobara, T. & T. Hori.** 1975. On the formation and germination of cyst in *Platymonas* and *Prasinocladus* (Prasinophyceae). *Bull. Jap. Soc. Phycol.* XXIII (3): 111-115.
- Lewin, R. & K. Lee.** 1985. Autotomy of algal flagella: electrón microscope studies of *Chlamydomonas* (Chlorophyceae) and *Tetraselmis* (Prasinophyceae). *Phycologia* 24:311–316.
- Maldonado, A.** 1943. Las lagunas de Boza, Chilca, Huacachina y los Gramadales de la Costa del Perú. Lima. Actas de Trabajo del 2do Congreso Peruano de Química. Lima.
- Mesbah, N.M. & J. Wiegel.** 2005. Halophilic thermophiles: a novel group of extremophiles. *In* Microbial Diversity: Current Perspectives and Potential Applications. T.Satyanarayana & B.N. Johri.eds. 91-118 p. I. K. International Pvt. Ltd. New Delhi.
- Montoya, H.T. & S. Golubic.** 1991. Morphological variability in natural populations of mat forming cyanobacteria in the salines of Huacho, Lima, Perú. *In* Cyanophyta (Cyanobacteria) Morphology, taxonomy, ecology. B. Hickel, K. Anagnostidis & J. Komarek.eds. 423 – 441p. Arch. Hydrobiol. Suppl. (Algological Studies 64:). E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Nägele & Obermiller). Stuttgart.
- Montoya, H.T. & A. Olivera.** 1993. *Dunaliella salina* Teodoresco (Chlorophyta) from saline environments at the Central Coast of Peru. *In* Saline lakes. V.S. Hurlbert ed. 155–161 p. Proceedings of the 5th International Symposium on Inland Saline Lakes. Bolivia. Kluwer Academic Publ.
- Montoya, H. T.** 2009. Algal and Cyanobacterial saline biofilms of the Grande Coastal lagoon, Lima , Peru. *In* Saline Lakes around the world: Unique systems with unique values. A. Oren, D. Naftz, P. Palacios and W.A. Wurtsbaugh. eds. 127-134p. Natural Resources and Environmental Issues.Vol XV. S.J. and Jessie E.Quinney Natural Resources Research Library, Logan, Utah, USA.
- Norris, R.E.** 1980. Prasinophytes. *In* Phytoflagellates. E. R.Cox. ed. 85- 145p. Elsevier North Holland, Inc. The Netherlands.
- Norris, R.E.; T. Hori & M. Chihara.** 1980. Revision of the genus *Tetraselmis* (Class Prasinophyceae). *Bot. Mag. Tokyo* 93: 317 - 339.
- Oseguera, L. A., J. Alcocer & E. Escobar.** 2010. Seston flux in a tropical saline lake. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* Vol.30. Part 10. 1477-1481 p. Stuttgart. Alemania.
- Provasoli, L.; J. McLaughlin & M. Droop.** 1957. The development of artificial media for marine algae. *Arch. fur Mikrobiol.* 25:392-428.
- Roberts. M.F.** 2005. Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems* 1:5. 68 p.
- Sorgeloos, P.** 1980. The use of brine shrimp *Artemia* in aquaculture. *In* the brine shrimp *Artemia*. Vol.3: 25 - 46. Universa Press. Welteren.
- Tanoue, E. & Y. Aruga.** 1975. Studies on the life cycle and growth of *Platymonas* sp. in culture. *Japanese J. of Botany* 20:439–460.
- Reynolds, C.** 2006. Ecology of Phytoplankton. Cambridge University Press. 524p.
- Sym, S.D. & R.N. Pienaar.** 1993. The class Prasinophyceae. *Progress in Phycological Research* 9: 281-376.
- Van den Hoff, J. & H. R. Burton.** 1989. An encystment stage, bearing a new scale type, of the Antarctic prasinophyte *Pyramimonas gelidicola* and its paleolimnological and taxonomic significance. *J. Phycol.* 25: 446-454.
- Viner-Mozzini, Y.; T. Zohary & A. Gasith.** 2003. Dinoflagellate bloom development and collapse in Lake Kinneret: a sediment trap study. *J. Plankton Res.* 25:591-602.
- Wetzel R.G.** 2001. Limnología. Lake and River ecosystems. 3r. ed. Academic Press. San Diego. 1006p.
- Woods, A.M.; R.C. Everroad & L.M. Wingard.** 2005. Measuring growth rates in microalgal cultures. *In* Algal Culturing Techniques. R.A. Andersen ed. 269-285 p. Phycological Society of America. Elsevier Academic Press.

